

特平 7-345689

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日	1990年 8月 9日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名	住友製薬株式会社

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

17.01.97

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 5 年 1 2 月 7 日

REC'D 31 JAN 1997

WIPO

出 願 番 号
Application Number:

平成 7 年特許願第 3 4 5 6 8 9 号

出 願 人
Applicant (s):

住友製薬株式会社

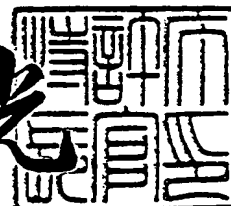


PRIORITY DOCUMENT

1 9 9 6 年 1 2 月 2 7 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



【書類名】 特許願

【整理番号】 132272

【提出日】 平成 7年12月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/19

【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子 F G F - 1 0

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 京都市左京区吉田下阿達町 京都大学薬学部内

【氏名】 伊藤 信行

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

【氏名】 根来 尚温

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

【氏名】 勝又 隆

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

【氏名】 田頭 秋三

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代表者】 武内 正康

【電話番号】 06-466-5214

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特平 7-345689

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】明細書

【発明の名称】線維芽細胞増殖因子 FGF-10

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1に示すアミノ酸配列のポリペプチドである線維芽細胞増殖因子をコードする塩基配列、またはこれに相補的な塩基配列を包含する組み換えDNA。

【請求項2】配列番号：2に示す塩基配列またはこれに相補的な塩基配列を包含する請求項1記載のDNA。

【請求項3】請求項1のDNAを担持する発現ベクター。

【請求項4】請求項3の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

【請求項5】宿主が動物細胞または大腸菌である請求項4記載の形質転換体。

【請求項6】請求項4の形質転換体を使用することを特徴とする組換え線維芽細胞増殖因子の製造方法。

【請求項7】配列番号：1に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。

【請求項8】請求項5の形質転換体が生産し、細胞増殖活性を示す事を特徴とする、配列番号：1に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規な線維芽細胞増殖因子（以下、FGFと略称）およびその組換え製法に関する。

【0002】

【従来の技術】FGFは、1970年代に血管新生因子として発見された。当初、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）や塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）が研究され、その構造や広範な細胞増殖促進作用が明らかにされてきた〔D. Gospodarowics他；ネイチャー（Nature）249巻123頁（1974）、Burgess, W. H. および Maciag, T. ; Ann. Rev. Biochem. 58巻575-606頁（1989）、SU

ZUKI, F. ; Clinical Calcium. 4巻1516-1517頁(1994)]。 現在では、計9種類のFGF類が報告されており、それぞれのクローニング、構造解析も成されている[細胞、27巻9号341~344頁(1995)]が、それ以外のFGF類の存在については可能性のみ示唆されていた。

【0003】

一方、bFGFやaFGFはその広範な細胞増殖促進作用を利用して、神経系、血管系や骨代謝系の疾患において、有望な治療剤となる可能性が検討されているが、現在もまだ、臨床治験に於ける有用性が証明されるには至っていない。新規なFGFでの同様の研究が待望されている。

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、新規なFGFの遺伝子を発見し解析することによって、その組換蛋白の工業的生産方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】発明者は、未知のFGFのDNAについて鋭意検討を行った結果、全く新しいタイプのFGF（以下、FGF-10と略称する）のDNAを取得することに成功し、本発明を完成するに至った。本発明は、以下に示すように、FGF-10をコードするDNA、当該DNAを担持した発現ベクター、形質転換体、それらを用いた組換蛋白の製造方法、および組換蛋白に関するものである。

【0005】

(1) 配列番号：1に示すアミノ酸配列のポリペプチドである線維芽細胞増殖因子をコードする塩基配列、またはこれに相補的な塩基配列を包含する組み換えDNA。

(2) 配列番号：2に示す塩基配列またはこれに相補的な塩基配列を包含する請求項1記載のDNA。

(3) (1)のDNAを担持する発現ベクター。

(4) (3)の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

(5) 宿主が動物細胞または大腸菌である(4)記載の形質転換体。

(6) (4) の形質転換体を使用することを特徴とする組換線維芽細胞増殖因子の製造方法。

(7) 配列番号：1 に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換線維芽細胞増殖因子。

(8) (5) の形質転換体が生産し、細胞増殖活性を示す事を特徴とする、配列番号：1 に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換線維芽細胞増殖因子。

【0006】

本明細書において、用語の意味または定義は下記の通りである。

・ FGF-10 : 哺乳類の産生する線維芽細胞増殖因子であり、配列番号：1 に示されるアミノ酸配列またはその主要部分を包含するもの。配列番号：1 に示されるアミノ酸配列の主要部分とは、配列番号：1 に示されるアミノ酸配列から、シグナル（プレ）配列またはプロ配列が除かれたマチュア蛋白アミノ酸配列を意味する。

・ 線維芽細胞増殖因子活性：細胞増殖刺激作用、造血幹細胞増殖作用、血管新生作用など種々の細胞に対する細胞増殖促進作用、細胞分化誘導作用や細胞外マトリックス改変作用などの分化調節作用、神経細胞の生存維持作用等、多岐に渡る FGF 類の生理活性のうちの少なくとも一種〔臨床検査 38 巻、11 号、219-221 頁（1994 年 増刊号）〕。

【0007】

以下、本発明をより詳細に説明する。

〔FGF-10 遺伝子の取得〕

本発明の FGF-10 をコードする DNA は、公知の遺伝子工学的方法にて製造出来る。すなわち、哺乳類の生体組織あるいは培養細胞から、mRNA を単離し、それから二本鎖 cDNA を得ることができる。さらに、この cDNA をプライマーに用いて、PCR 法を行い、増幅し、適宜配列を決定できる。これらはいずれも専用キットが市販されている。なお、mRNA の原料の生体組織や培養細胞は特に種類を限定されるものではないが、特に、約 14 日令のラット胎児を用いる方法が好適である。また、肺や関節組織において mRNA 発現が比較的多いた

め、肺細胞、骨／軟骨由来細胞由来の培養細胞等も用いる。

【0008】

また、本特許明細書に開示のFGF-10をコードするDNA配列の中から、適当な配列をDNAプローブとして用い、種々の生体由来のcDNAまたはゲノム遺伝子ライブラリーからクローニングすることができる。

遺伝子ライブラリーは常法に従って、下記のように調製する。1. 動物組織を凍結粉末化したものをRNAase及びプロテアーゼ処理し、高分子量DNAを沈澱させて得る。DNA抽出物については、市販のものが利用できる〔クローンテック (clontech) 社等〕。2. 制限酵素 (EcoRI等) で部分的に切断し、エタノール沈澱でDNA断片を得る、3. DNAリガーゼを用いて、λファージにDNA断片を挿入し、4. 市販のin vitroパッケージングキットを用いて、パッケージングを行い、遺伝子ライブラリーを作る。

DNAプローブは、本特許明細書に開示のFGFファミリー蛋白をコードするDNA配列の中から、特異性の高い配列を選ぶ。常法により、化学合成し、³²P等でラベルすることができる。

【0009】

〔FGF-10蛋白質の製造〕

こうして得られたFGF-10のcDNAを組み込む発現ベクターとしては、適当な大腸菌、枯草菌、酵母、動物昆虫細胞等の宿主内で増殖できるプラスミドやファージが選ばれるが、例えば、大腸菌由来のpBR322、pBR325〔ジーン (Gene), 4121 (1978)〕、枯草菌由来pUB110〔バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 112巻, 678頁 (1983)〕、COS細胞に好適なpCDM8等が挙げられる。cDNAをプラスミドに組み込む方法としては、常法が、マニアティス (T. Maniatis) 他、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning)、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー (Cold spring harbor lab.) 239頁 (1982) に記載されている。

【0010】

宿主は、ベクターの導入により形質転換され、FGF-10を産生できる生物や培養細胞であれば、特に限定されない。細菌としては、大腸菌、枯草菌（バチルス類）等、酵母としては、サッカロマイセス属、トルラ属、ピキア属等、動物細胞としては、CHO細胞、NSO細胞等が代表例である。培養昆虫細胞、真菌、植物細胞、単細胞系だけでなく、目的蛋白質遺伝子を組み込まれた昆虫や哺乳類、植物も宿主の範疇に入る。

【0011】

形質転換体から、公知の方法、例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法〔ジーン（Gene），10巻 63頁（1980）〕およびDNA塩基配列決定法〔プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）74巻560頁（1977）〕を用い、所望のクローンを選出する。また、COS細胞にて一過性に発現させ、培養上清の生理活性を評価してクローン選択することも可能である。

【0012】

発現されたFGF-10蛋白の生理活性は、常法により容易に検出できる。たとえば、公知のFRSK細胞など、上皮細胞の増殖促進作用を測定することにより評価できる。

【0013】

クローン化されたDNA含有プラスミドは、そのままあるいは制限酵素で切り出して利用することが可能であり、種々の宿主に適応した発現ベクターに組み込んで発現させ、FGF-10蛋白を大量に製造することができる。発現方法は特に制限されず、細菌を用いた融合発現、分泌発現および直接発現、また真核細胞を用いた発現など適宜、当該分野で公知の組換蛋白生産技術が応用しうる。

【0014】

組換技術により生産されたFGF-10蛋白は、生化学の分野で常用される精製方法にて精製が可能である。イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相HPLC、硫酸沈澱、限外濾過、SDS-PAGEなどが適宜組み合わせて用いられるが、FGF類の場合、特にヘパリン等のリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィー、抗体カラムクロマトグラフィーなどが大量精製に好適であ

る。FGF-10蛋白に対する抗体は、ポリクローナル、モノクローナル共に、自体公知の方法で作製し得る。FGF-10特異的抗体は抗体カラムに使用出来るだけでなく、ELISA等の免疫化学的定量法に使用できる。

【0015】

【作用】

上述の方法で得られたFGF-10蛋白は、細胞増殖促進作用を始めとする種々の生理作用を有しており、創傷治癒促進剤、循環不全治療剤、神経生存維持剤、発毛促進剤などの医薬用途に用いる。特に、成体哺乳類の軟骨組織での発現が認められており、骨折治癒等の骨疾患治療剤、軟骨・結合組織の損傷治療剤への応用が考えられる。また、細胞増殖促進用の実験試薬としても使用しうる。

【0016】

【実施例】以下の実施例によって、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

【実施例1】FGF-10遺伝子の構造解析

・ラット遺伝子ライブラリーの調製

14日齢ウィスターラット胎児全組織から、常法〔Chomoczynski他、Anal. Biochem. 162巻, 156-159頁(1987)〕に従い、mRNAを調製した。そのラット胎児mRNAを鋳型に、ランダムプライマー(6mer)をプライマーとして、モロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素を用いてラット胎児cDNAを調製した。すなわち、ラット胎児ポリ(A)+RNA(5μg)を300ユニットのMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase(GIBCO-BRL)、15ユニットのhuman placenta RNase inhibitor(和光純薬工業)および0.5μgのランダムプライマー(6mer)を含む反応溶液中で37℃60分インキュベートして、cDNAを得た。

【0017】

・FGF-3及びFGF-7に共通なプライマーの作成

既知の7種類のヒトFGFのアミノ酸配列を比較し、FGF-3、FGF-7間でアミノ酸配列が同一である2箇所(Tyr-Leu-Ala-Met-Asn

-Lys、Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Ser)を選び、図1に示す2種類のFGFプライマーを作成した。

【0018】

・FGFファミリーDNAの増幅

ラット胎児cDNAを鋳型にし、上記の2種類のFGFプライマーとTaq DNA polymeraseを用いたpolymerase chain chain (PCR)法によりFGFファミリーDNAを増幅した。即ち、適当量のcDNA、0.05ユニット/ μ lのTaq DNAポリメラーゼ(和光純薬工業)および5 pmol/ μ lの前述のセンサーまたはアンチセンスプライマーを含む反応溶液(25 μ l)を30サイクルのPCRに供した。反応後、溶液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望のサイズ(～110塩基対)のフラクションを電気泳動で溶出した。

【0019】

・FGFファミリーDNAのスクリーニング

FGFプライマーにより増幅したFGFファミリーDNAをpGEM-T DNA vector (Promega)に挿入し、得られた組換えベクターを大腸菌(XL1-blue株)に感染させ、DNAクローンを得た。cDNA配列の解析には、DNAシーケンサー373A (Applied Biosystems Inc.)を用いた。

各DNAクローンの塩基配列を決定したところ、既知のFGF-3、FGF-7のcDNA以外にも、既知のFGFファミリーペプチドと類似のアミノ酸配列構造を持つ(～50%)ペプチドをコードしている新規なFGFcDNAが単離された。これを、FGF-10と命名した。

【0020】

・FGF-10 cDNAの全翻訳領域の構造解析

上記実験にて判明したFGF-10 cDNAの部分構造から、図2に示す幾つかのプライマーを作成し、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)法[Frohman, PCR Protocols - A guide to methods and applications

, Academic Press, pp. 28-38 (1990)] を利用して全翻訳領域を取得した。詳細は以下〔1〕～〔5〕に記述する。〔1〕FGF-10 cDNAの部分構造から図2に示すプライマーA～Dを作成し、また、RACE法用として、プライマーX及びYを作成した。〔2〕ランダムヘキサオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてラット胎児mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した後、デオキシアデニン三リン酸の存在下に3' デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを作用させて3' 末端にポリ(A)配列を付加した。このようにして得られたcDNAを鋳型としてプライマーBおよびXを用いてPCRを行った。さらに、プライマーAおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue)を形質転換することによりクローン化した。数クロンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをpFGF-10(5')と命名した。〔3〕プライマーXを用いてラット胎児mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した。このようにして得られたcDNAを鋳型として、プライマーCおよびYを用いてPCRを行った。さらに、プライマーDおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue株)を形質転換することによりクローン化した。数クロンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをpFGF-10(3')と命名した。〔4〕pFGF-10(5')より得られた最も上流部分の塩基配列と、pFGF-10(3')より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列より、各々プライマーEおよびFを作成した。〔5〕ラット胎児mRNAを鋳型として、オリゴdTをプライマーとして逆転写酵素により、cDNA第一鎖を得た。これを鋳型としてプライマーEおよびFを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue株)を形質転換することによりクローン化した。数クロンの塩基配列を決定したところ、pFGF-10(5')より得られた最も上流部分の塩基配列と、pFGF-10(3')より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列を連続して保持するクローンが得られた。この中の1クローンを選び、pFGF-10と命名した。このプラスミドに担持される全

翻訳領域を含むFGF-10 cDNAを解析し、配列番号：2の塩基配列（804bp）を決定した。

【0021】

・FGF-10の全アミノ酸配列の決定

上記実験で得られたFGF-10 cDNAの塩基配列より、FGF-10 cDNAの翻訳領域は645bpからなり、FGF-10は配列番号：1で示される215アミノ酸からなる新規FGFであることが明らかになった。

【0022】

【実施例2】ラットFGF-10の哺乳動物細胞での発現

・プラスミドの構築

プラスミドpFGF-10（図3）をSphIとPstIで消化し、ポリアクリルアミド電気泳動によりcDNA全長を含む断片を単離した。この断片をpUC19のSphI、PstI消化物とライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換することにより、FGF-10 cDNAを含むプラスミドpUC-F10を得た。pUC-F10をHindIII及びXbaIで消化することによりFGF-10 cDNAを含む断片を切出し、哺乳動物細胞発現ベクターであるpCDM8のHindIII、XbaI消化物とライゲーションし、大腸菌MC1061/P3株を形質転換することにより、CMVプロモーターの支配下にFGF-10 cDNAを有するプラスミドpCDM8-F10SPを得た。

【0023】

一方、FGF-10 cDNAにおける推定翻訳開始コドン上流の塩基配列がコザックのコンセンサス配列からはずれていることから、本mRNAの翻訳効率が悪くない可能性があることが考えられた。そこで、翻訳効率の向上を目的として、推定翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換する変異を導入することとした【マリリン コザック (M. Kozak)、ザ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (The Journal of Cell Biology) 108巻 229-241頁 (1989. 2)】。変異の導入はPCRを利用し、pFGF-10を鋳型として 図4に示す、5'末端にHindIII切断部位およびコザックのコンセンサス配列を有するセンスプライマーと、5'

末端にXba I 切断部位を有するアンチセンスプライマーを用いることにより行った（反応条件は図4 参照）。

反応終了後、PCR産物をフェノールクロロホルム処理、エーテル処理、ついでエタノール沈澱を行い、Hind III およびXba I で消化した後、ポリアクリルアミド電気泳動により約700塩基対の断片を単離した。この断片を哺乳動物細胞発現ベクターであるpCDM8のHind III、Xba I 消化物とライゲーションし、大腸菌MC1061/P3株を形質転換して得られたコロニーの中から4クローンを選び、DNAシーケンサー（パーキンエルマー373型）を用いて塩基配列の解析を行った。その結果、いずれのクローンも推定翻訳開始コドン上流の塩基配列はコザックのコンセンサス配列に置換されており、かつコードするアミノ酸配列に影響する変異は起きていなかったもので、これらの中から1クローンを選び、本プラスミドをpCDM8-F10HXと命名した。

【0024】

【実施例3】ラットFGF-10発現可能なプラスミドによるCOS-1細胞の形質転換

実施例2で構築したラットFGF-10発現可能なプラスミド、pCDM8-F10SP及びpCDM8-F10HXを通常の方法に従って大量に調製し、塩化セシウム密度勾配超遠心を2回行って精製した。これら2種類のプラスミド及びコントロールとしてpCDM8を用いて、電気パルス法によりCOS-1細胞の形質転換を行った。形質転換された細胞は、リジンセファロースクロマト処理した牛胎児血清10%を含有するDMEMで24時間培養された後、培地を無血清のDMEMに交換、さらに継続して96時間培養された。このようにして得た培養液を遠心後、その上清を分注し-80℃で凍結保存した。

【0025】

【実施例4】in situ ハイブリダイゼーション法による軟骨におけるFGF-10 mRNAの発現の確認

・プローブの調製：FGF-10 cDNAをpGEM-Tベクターに組み込み、そのプラスミドを大腸菌JM-109にトランスフェクトした後、大量培養を行い、ファルマシア社のFlexi Prep kitを用いて純度の高いFGF

-10 cDNAを精製した。パーキンエルマー373A/DNAシーケンサーを用いて配列を確認したのち、ベーリンガー社のDIG/RNAラベリング キット (SP6/T7) を用いてcRNAプローブを作成した。

【0026】

・切片作成：ウイスター系雌性ラットを3週令で屠殺後、大腿骨と脛骨を関節を保持した状態で摘出し、軟部組織を除去し、適当な大きさにトリミング後、素早く固定液（4%パラホルムアルデヒド）に浸し、4℃で一晩固定した。脱水後、脱灰液（10%EDTA、15%グリセロール-PBS）に浸し、4~5日間脱灰を行った（毎日、液は交換した）。その後、膝関節前後約2cmにトリミングし、O.C.Tコンパウンドに浸し、液体窒素にて凍結させ、クリオスタットを用いて厚さ10 μ mの関節組織切片を作製し、シランコーティングスライドグラスにマウントした。

・ハイブリダイゼーション：前述の関節組織切片の前処理（プロテイナーゼK消化、0.2M HClで内在性のアルカリフォスファターゼを不活化、0.1M TEA：0.25%無水酢酸でアセチル化）を行った後、エタノール系列で脱水し風乾した。そして前述のプローブをハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10mM Tris-HCl/pH7.6、200 μ g/ml tRNA、1 \times Denhardt's solution、10%Dextran sulfate、600mM NaCl、0.25%SDS）で10倍に希釈し、一切片当り50 μ l載せ、小さく切ったパラフィルムで覆い、50℃で16時間インキュベーションした。RNase Aで不要なプローブを消化しSSCで洗浄した後、抗体反応、発色反応を行った。

【0027】

・抗体反応および発色反応：プローブの洗浄が終わった切片をブロッッキング液に60分浸した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（Anti-Digoxigenin-AP: Fab fragment：ベーリンガーマンハイム）を乗せ、37℃で1時間インキュベーションした。抗体液を洗った後、NBT、X-フォスフェイトを加え、37℃でインキュベーションし発色反応を行った（12時間）。発色を確認した後、発色停止液（10mM Tri

s-HCl/pH 7.6、1 mM EDTA/pH 8.0) に漬け、蒸留水で洗った後、水性封入した。

・結果：図 5 (A) (B) に示すように軟骨細胞に発色が確認された。FGF-10 の mRNA が軟骨細胞に発現していることから、FGF-10 は軟骨に対する活性を有する骨および軟骨の損傷修復等に関与する因子であると推定される。

【0028】

〔実施例 5〕FRSK 細胞を用いた細胞増殖活性の検討

・細胞培養：ラットの上皮細胞である FRSK 細胞は、培養面積 75 平方 cm の培養フラスコ当り 15 ml の 10% ウシ胎児血清を含む F-12 培地を用いて、37℃、5% 二酸化炭素/95% 空気の気相下で培養した。細胞は 7 日に一度、1/10 の割合で継代を行った。

・FGF-10 蛋白の発現：FGF-10 を COS-1 細胞で一過性に発現させ（実施例 3 参照）、その培養上清を以下のアッセイに供した（以下、pCDM8-F10SP を用いて得られた培養上清を FGF-10/Sp、pCDM8-F10HX を用いて得られた培養上清を FGF-10/Hx、コントロールプラスミド pCDM8 を用いて得られた培養上清を Bq と表示する）。

・DNA 合成アッセイ（トリチウム標識チミジンの取込み）：細胞をサブコンフルエントまで培養した後、トリプシン処理により細胞を剥がし、上記培地を用いて 10000 細胞/ml に調整し、96 穴プレートに 100 μ l ずつ播き込み、37℃、5% 二酸化炭素/95% 空気の気相下で培養を行った。2 日に一度、培地を新しい上記培地 100 μ l に交換し、7 日間培養を行った後、培地を 0.1% ウシ血清アルブミンを含む F-12 培地 100 μ l に交換した。24 時間後、COS 上清を 25 μ l 添加し、18 時間 37℃、5% 二酸化炭素/95% 空気の気相下で培養を行い、0.2 μ Ci のトリチウム標識チミジンを含む F-12 培地 20 μ l を添加、引続き同条件下で培養した。4 時間後培地を除去し、2N NaOH を 50 μ l 添加して 30 分静置、細胞を死滅させた。1N HCl で中和後、細胞をセルハーベスターで回収し、ベータプレートにてカウントを計測した。

・結果：図 6 に示すように、コントロール群：Bq (100%) と比較して、F

GF-10発現群：Sp、HxはFRSK細胞のトリチウム標識チミジンの取込みを大きく増加させた（各々286%、501%）。FGF-10は上皮細胞の増殖を促進する因子であることが示唆される。

【0029】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：215

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ラット

配列

Met	Trp	Lys	Trp	Ile	Leu	Thr	His	Cys	Ala	Ser	Ala	Phe	Pro	His	Leu
1				5					10					15	
Pro	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Phe	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Ser	Val
			20					25					30		
Pro	Val	Thr	Cys	Gln	Ala	Leu	Gly	Gln	Asp	Met	Val	Ser	Pro	Glu	Ala
			35				40					45			
Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe
	50					55						60			
Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Gly	Arg	His	Val	Arg	Ser	Tyr	Asn	His	Leu
65				70					75					80	
Gln	Gly	Asp	Val	Arg	Trp	Arg	Lys	Leu	Phe	Ser	Phe	Thr	Lys	Tyr	Phe
			85					90						95	
Leu	Lys	Ile	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys	Val	Ser	Gly	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn
			100					105						110	
Cys	Pro	Tyr	Ser	Ile	Leu	Glu	Ile	Thr	Ser	Val	Glu	Ile	Gly	Val	Val
		115						120						125	
Ala	Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Lys
		130					135							140	
Gly	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Lys	Glu	Phe	Asn	Asn	Asp	Cys	Lys	Leu	Lys

特平 7-345689

145	150	155	160
Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp			
	165	170	175
Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala			
	180	185	190
Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe			
	195	200	205
Leu Pro Met Val Val His Ser			
	210	215	

配列番号 : 2

配列の長さ : 804 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : ラット

配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 109-753

特徴を決定した方法 : S

配列

TAACCAGTAG CCATCACCTC CAGCTGTCTC TTTGCCTCGC ACCAGGTCTT ACCCTTCCAG	60
TATGTTCCCTT CTGATGAGAC AATTTCCAGT GCCGAGAGTT TCAGTACA ATG TGG AAG	117
TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCG GGC TGC	165
TGT TGC TGC TTC TTG TTG CTC TTC TTG GTG TCT TCC GTC CCT GTC ACC	213
TGC CAA GCT CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCG GAG GCT ACC AAC TCC	261
TCT TCC TCC TCC TCT TCC TCC TCC TCG TCC TCT TCC TTC TCC TCT CCT	309

TCC AGC GCG GGG AGG CAT GTG CGG AGC TAC AAT CAC CTC CAG GGA GAT 357
 GTC CGC TGG AGA AAG CTG TTC TCC TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT 405
 GAA AAG AAC GGC AAG GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAA AAC TGT CCG TAC 453
 AGT ATC CTA GAG ATA ACA TCA GTG GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA 501
 GCC ATT AAC AGC AAC TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC 549
 TAT GGC TCA AAA GAA TTT AAC AAT GAC TGT AAA CTG AAA GAG AGG ATA 597
 GAG GAA AAT GGA TAC AAC ACC TAT GCA TCT TTT AAC TGG CAG CAC AAC 645
 GGC AGG CAA ATG TAT GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCC AGG AGA 693
 GGA CAA AAA ACA AGA AGG AAA AAC ACC TCC GCT CAC TTC CTC CCC ATG 741
 GTG GTC CAC TCA TAGAAGA AGGCACCGTT GGTGGATGCA GTACAACCAA TGACTCTTTG 800
 CCAA

【図面の簡単な説明】

【図1】FGF-10遺伝子のクローニングに用いた2種類のFGF-3、FGF-7、FGF-10共通プライマー、(A) Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys、(B) Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Serを示す。

【図2】Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法に用いたFGF-10 cDNA単離用プライマーを示す。

【図3】プラスミドpFGF-10から、プラスミドpCDM8-F10SPおよびpCDM8-F10HXを得るまでのプラスミド構築方法の概略。

【図4】翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換するために用いたプライマーおよびPCR反応条件。

【図5】in situ ハイブリダイゼーション法によるラット関節組織におけるFGF-10 mRNAの発現。(A)：関節軟骨標本の顕微鏡写真。

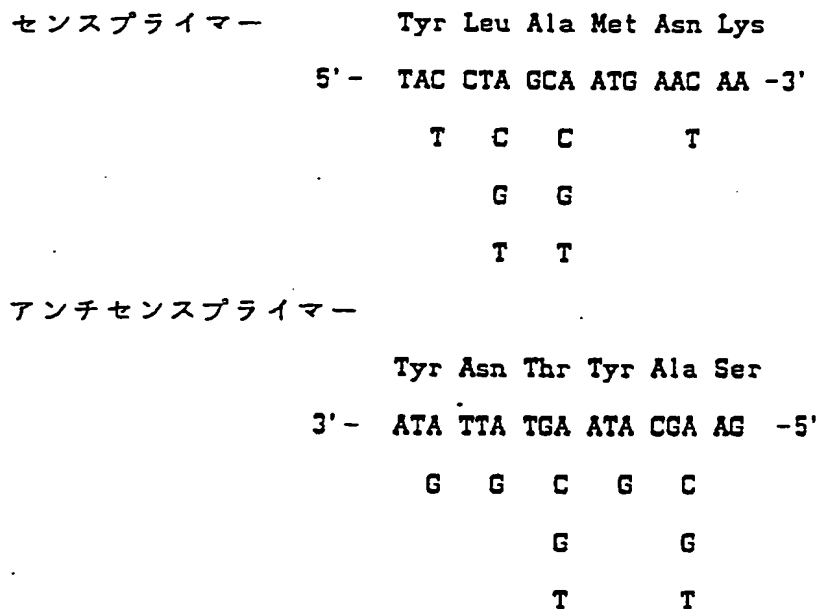
(B)：骨端軟骨板の顕微鏡写真。

【図6】トリチウム標識チミジンのFRSK培養細胞への取込みを示すグラフ。横軸Bqはコントロール、Sp、HxはそれぞれFGF-10発現COS細胞の培養液を加えた場合を示す。縦軸は細胞内の放射活性。

【書類名】

図面

【図1】



【図2】

5' RACE法: A: 5'-CCT CTC TTT CAG TTT ACA GTC -3'

B: 5'-TCC ATT TTC CTC TAT CCT CTC -3'

X: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

Y: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT -3'

3' RACE法: C: 5'-AGA AGG GGA AAC TCT ATG GC -3'

D: 5'-GAC TGT AAA CTG AAA GAG AGG -3'

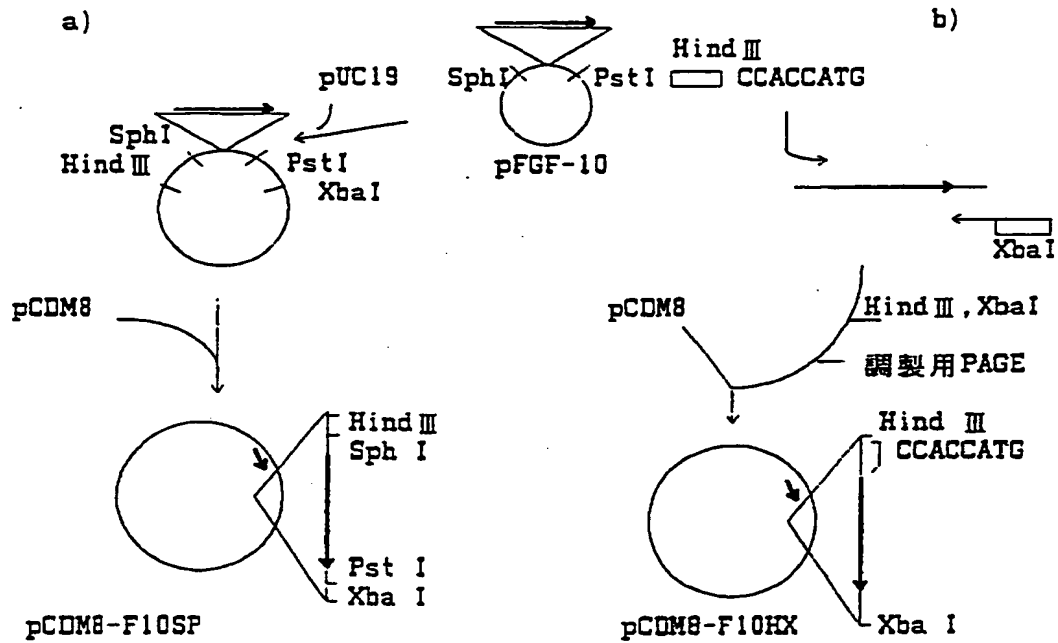
X: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

Y: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT -3'

全配列 E: 5'-CTT CCA GTA TGT TCC TTC TG-3'

増幅用 F: 5'-GGC AAA GAG TCA TTG GTT GT-3'

【図3】



【図4】

推定翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換するために用いたプライマーの塩基配列

名称	塩基数	配列(5' → 3')
F10HS	35mer	TTTTAAGCTT CCACC ATGTGGAAGTGGATACTGAC
F10XR	27mer	AAAATCTAGA GTCATTGGTTGTACTGC

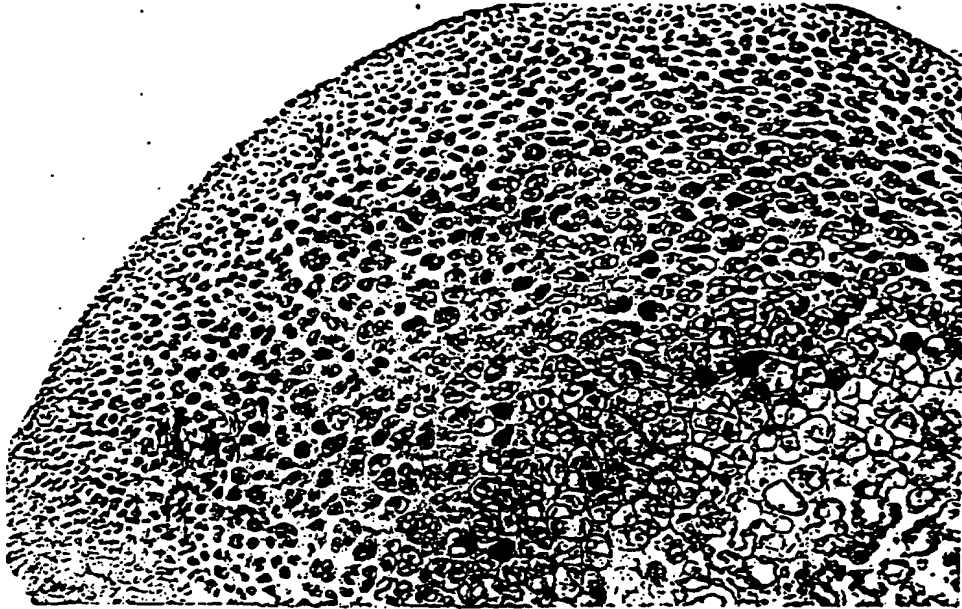
反応条件:

pFGF-10(0.5 μg/μl)	2	μl
10xPCR buffer	10	
10 μM F10HS	2.5	
10 μM F10XR	2.5	
dNTP mix(TaKaRa)	8	
dH2O	74.5	
AmpliTaQ	0.5	/100 μl

94℃	30 秒	x 10回
94℃	60 秒	
56℃	60 秒	
72℃	60 秒	
72℃	9 分	

変異導入切片

【図5】

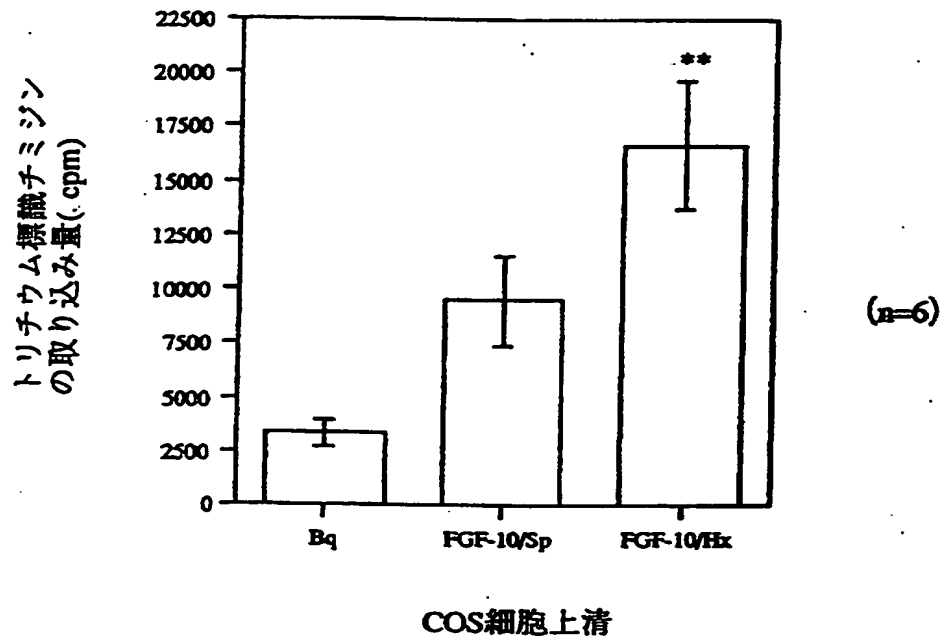


(A) 関節軟骨の薄切り組織標本の顕微鏡写真



(B) 骨端軟骨板の薄切り組織標本の顕微鏡写真

【図6】



COS細胞上清添加後のFRSK細胞によるトリチウム標識チミジンの取り込み量の変化。
 値は平均±標準誤差で、有意差はBqに対して**； $P<0.01$ で示した。

特平 7-345689

整理番号 132272

【書類名】要約書

【要約】

【課題】新規なアミノ酸配列構造を有する線維芽細胞増殖因子FGF-10をコードするDNA、および組換蛋白とその製法を提供する。

【構成】特定のアミノ酸配列をコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを、宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養して蛋白を産生させ、組換FGF-10を得る。

【効果】FGF-10は、細胞増殖作用を利用した医薬、実験試薬として応用し得る。

【選択図】なし

特平 7-345689

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000183370

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】

住友製薬株式会社